

УДК 577.112.856:577.212:616.1(470.22)

ЛЮДМИЛА ВЛАДИМИРОВНА ТОПЧИЕВА

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биологии, Карельский научный центр РАН

*topchiev@krc.karelia.ru***НИКОЛАЙ ЛЬВОВИЧ РЕНДАКОВ**

кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биологии, Карельский научный центр РАН

*nlrend@mail.ru***СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ КОЛОМЕЙЧУК**

кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биологии, Карельский научный центр РАН

*sergey_kolomeychuk@rambler.ru***ЭДУАРД ВЛАДИМИРОВИЧ ГУРОВ**

аспирант Института биологии, Карельский научный центр РАН

*gurov_ev@pochta.ru***ВИКТОРИЯ АЛЕКСЕЕВНА КОРНЕВА**

кандидат медицинских наук, Больница скорой медицинской помощи (г. Петрозаводск)

*vikkorneva@mail.ru***ИРИНА ЕВГЕНЬЕВНА МАЛЫШЕВА**

кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биологии, Карельский научный центр РАН

*mal-ir@mail.ru***РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E
В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИИ**

Изучено распределение частот аллелей и генотипов гена аполипопротеина E в группах лиц, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, и людей из контрольной группы. Показано, что частота аллеля e4 и генотипа e3/e4 выше у пациентов с диагнозами артериальная гипертензия и обширный инфаркт миокарда, чем в контрольной группе. Наличие в генотипе аллеля e4 в 2 раза повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у жителей Карелии. Обнаружена ассоциация между наличием аллеля e4 в генотипе и развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, обширный инфаркт миокарда, аполипопротеин E, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Нарушение липидного обмена является одним из факторов, способствующих возникновению сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), таких как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и обширный инфаркт миокарда (ОИМ). Существенную роль в метаболизме липидов играет белок плазмы крови аполипопротеин E (ApoE). Он выступает в качестве лиганда для рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) клеток печени. Ген *apoE*, кодирующий данный полипептид, расположен на 19-й хромосоме и имеет несколько полиморфных сайтов как в промоторной части, так и в экзонах. Самый изученный из них – полиморфизм в позициях 3937C/T и 4075C/T. Замена нуклеотидов приводит к замене аминокислот в положениях 112 и 158 аминокислотной последовательности белка, что, в свою очередь, способствует изменению сродства ApoE к рецепторам. Последнее обстоятельство влияет на уровень холестерина и других показателей липидного обмена в плазме крови. Так, показано, что наличие в генотипе аллеля e4 ассоцииру-

ется с атерогенным профилем, повышенным уровнем холестерина, липопротеинов низкой плотности в крови [4], [5]. Аллелю e2, напротив, приписывают протективную, антиатерогенную роль. У носителей этого аллеля, как правило, понижено содержание холестерина и повышено содержание триглицеридов [12]. Результаты исследований, проведенных в ряде европейских и азиатских стран, позволяют отнести аллель e4 к независимому фактору риска возникновения кардиоваскулярных расстройств [14]. Однако для населения других стран, например Финляндии, взаимосвязи между наличием в генотипе аллеля e4 и развитием сердечно-сосудистых заболеваний обнаружено не было [5], [9]. Таким образом, связь полиморфизма гена *apoE* с развитием ССЗ у разных групп населения специфична, что указывает на важность изучения этой проблемы в разных этнических группах и у жителей регионов с различными климато-географическими факторами. Необходимо отметить, что у населения Карелии, проживающего в

условиях нестабильного климата и светового режима Европейского Севера, полиморфизм гена *apoE*, который может быть связан с риском развития ССЗ, до настоящего времени не изучался.

Цель настоящего исследования состояла в изучении роли полиморфизма гена аполипопротеина Е в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у населения Республики Карелия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали образцы крови 138 доноров без клинических проявлений ССЗ (контрольная группа) и 110 образцов крови больных, перенесших ОИМ и страдающих АГ. Диагнозы ИБС и ОИМ устанавливали в соответствии с МКБ-10 и с учетом клинических рекомендаций ВНОК (2008), диагноз АГ – в соответствии с третьим пересмотром клинических рекомендаций ВНОК (2008). Средний возраст обследованных в контрольной группе и пациентов с ССЗ составил 36,7 и 61,0 года соответственно.

ДНК выделяли из крови на колонках для выделения ДНК «Ахургер» (Axygen) согласно инструкции к набору. Качество и количество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически (SmartSpec Plus, Bio-Rad).

Исследование распределения аллелей гена *apoE* проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Для амплификации гена *apoE* использовали следующую пару праймеров: прямой 5'-acagaattcgccccggcctgtgacac-3', обратный 5'-taagcttgacggctgtccaagga-3' [8]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad). Реакционная смесь для ПЦР объемом 30 мкл содержала: 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ обратного и прямого праймеров, 1 ед. Taq полимеразы (Силекс), 0,2 мМ dNTP, 2,5 мкл 10хбуфера для Taq полимеразы, 3 % DMSO согласно инструкции к набору для ПЦР (Силекс). Условия ПЦР: денатурация – 2 мин при 94 °С, отжиг – 1 мин при 60 °С, элонгация – 1 мин при 72 °С; количество циклов – 35; дотраивание фрагментов – 10 мин при 72 °С. ПЦР-фрагменты в течение 15 ч при 37 °С обрабатывали эндонуклеазой рестрикции NhaI (5 е. а.) (Fermentas) согласно инструкции к набору.

ПЦР-продукты разделяли в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ), используя трис-боратный буфер. ПЦР-продукты окрашивали бромистым этидием, визуализировали в проходящем УФ-свете и анализировали с помощью программы Kodak 1D. Аллели и генотипы определяли в соответствии с J. E. Nixson и D. T. Vernier [8]. Статистический анализ данных осуществляли с помощью пакета программ MS Excel 2005. Достоверность различий частот в группах оценивали по критерию χ^2 , критерию Фишера с преобразованием [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПДРФ-анализа были получены, согласно J. E. Nixson и D. T. Vernier [8], следующие аллельные варианты гена *apoE*: e2 (Cys112, Cys158), e3 (Cys112, Arg158), e4 (Arg112, Arg158) и генотипы: три гомозиготных (e2/e2, e3/e3, e4/e4) и три гетерозиготных (e2/e3, e2/e4, e3/e4).

Обнаружено, что самый распространенный аллель в исследуемой выборке – аллель e3, а самый распространенный генотип – e3/e3 (табл. 1). Необходимо отметить, что встречаемость этого аллеля и генотипа у жителей Карелии такая же, как и в большинстве популяций мира [11]. Частоты других аллелей и генотипов гена *apoE* у здоровых жителей Карелии близки к частотам, характерным для населения стран Центральной и Восточной Европы, некоторых регионов России, например для русского населения Костромской области и бурятов [1], [4]. Генотип e4/e4 в исследуемой выборке встречался только у одного индивида, перенесшего ОИМ.

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов гена *apoE* среди обследованных доноров

Аллели и генотипы	Здоровые (n = 138)	Больные ССЗ (n = 110)
e2	0,09	0,11
e3	0,76	0,67
e4	0,14	0,22
Критерий χ^2		3,16 (p > 0,05)
e2/e2	0,04	0,05
e2/e3	0,08	0,07
e2/e4	0,03	0,05
e3/e3	0,59	0,44
e3/e4	0,26	0,49
Критерий χ^2		7,22 (p > 0,05)

В группе пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями обнаружено 55 % носителей аллеля e4, тогда как лиц, у которых этот аллель отсутствовал, – лишь 38 %. В контрольной группе, напротив, количество людей, в генотипе которых не было аллеля e4, преобладало над числом его носителей. Причем отличие в распределениях было достоверно по критерию χ^2 (p < 0,05) (табл. 2). Наличие в генотипе аллеля e4 почти в 1,5 раза повышает риск развития ССЗ у жителей Карелии (относительный риск RR = 1,45).

Таблица 2

Соотношение здоровых и больных ССЗ жителей Карелии в зависимости от наличия аллеля e4 гена *apoE*

	Отсутствие аллеля e4	Наличие аллеля e4
Здоровые	0,62 (n = 98)	0,45 (n = 40)
Больные ССЗ	0,38 (n = 61)	0,55 (n = 49)
Критерий χ^2		6,7 (p < 0,05)
Критерий Фишера (F)	15 (p < 0,05)	2,4 (p > 0,05)

Из данных табл. 1 следует, что частота аллеля е4 и генотипа е3/е4 выше в группе людей, страдающих ССЗ. Среди пациентов, которым поставлен диагноз АГ и ОИМ, носителей аллеля е4 и генотипа е3/е4 также больше, чем в контрольной группе (табл. 3).

Таблица 3

Частоты аллелей и генотипов гена *apoE* среди здоровых доноров и больных АГ и ИБС

Аллели и генотипы	Здоровые (n = 138)	Больные АГ (n = 62)	Больные ОИМ (n = 31)
е2	0,09	0,11	0,16
е3	0,76	0,69	0,61
е4	0,14	0,19	0,23
Критерий χ^2		1,15 ($p > 0,05$)	3,3 ($p > 0,05$)
е2/е2	0,04	0,05	0,06
е2/е3	0,08	0,08	0,13
е2/е4	0,03	0,05	0,06
е3/е3	0,59	0,48	0,35
е3/е4	0,26	0,34	0,39
Критерий χ^2		2,4 ($p > 0,05$)	6,1 ($p > 0,05$)

Зависимость частоты ССЗ от наличия в генотипе обследованных тех или иных аллелей гена *apoE* обусловлена уровнем холестерина и липопротеинов низкой плотности. Изоформы белка АроЕ, соответствующие аллелям гена, имеют разную эффективность связывания с рецептором ЛПНП. Белок АроЕ как лиганд ЛПНП-рецептора участвует в превращении липопротеинов промежуточной плотности (ЛППП) в ЛПНП [3].

Выведение ремнантных частиц, содержащих АроЕ е2, происходит очень медленно из-за неэффективного связывания этой изоформы белка с соответствующими рецепторами, при этом превращение ЛППП в ЛПНП нарушено. Снижение вследствие этого доставки холестерина в печень приводит к увеличению синтеза ЛПНП-рецепторов и, соответственно, к уменьшению концентрации ЛПНП в плазме. Выведение частиц, несущих АроЕ е4, напротив, идет быстрее, чем выведение нормальных частиц, что замедляет синтез ЛПНП-рецепторов и увеличивает уровень холестерина ЛПНП плазмы.

Следует отметить, что хотя аллелю е2 приписывают протективное значение, у людей, гомозиготных по этому аллелю, может развиваться гиперлиппротеинемия III типа.

Анализ распределения аллелей гена аполипопротеина Е в зависимости от пола показал отсутствие статистически значимых различий в частотах аллелей у мужчин в контрольной группе и у больных ССЗ. Однако из результатов табл. 4 следует, что в группе мужчин, страдающих сердечно-сосудистыми расстройствами, частота аллеля е2 была больше, чем у здоровых. Эти данные несколько противоречат общепри-

знанному представлению о протективной роли аллеля е2. Однако их можно объяснить и наличием других независимых факторов возникновения ССЗ у мужчин, например зависимостью от табака. Так, в исследованиях, проведенных на мужчинах корейской национальности, имеющих пристрастие к курению, показано, что несмотря на низкие показатели общего холестерина в плазме крови, в этой группе лиц была высокая частота ИБС и других сердечно-сосудистых расстройств [9]. Интересно, что курение также может модифицировать влияние полиморфных вариантов гена *apoE* на уровень триглицеридов [13]. Так, в плазме крови курящих мужчин независимо от наличия в генотипе аллелей гена *apoE* наблюдали более низкие значения триглицеридов по сравнению с некурящими людьми.

Таблица 4

Распределение аллелей и генотипов гена *apoE* среди здоровых и больных ССЗ доноров в зависимости от пола

	Аллели и генотипы							
	е2	е3	е4	е2/е2	е2/е3	е2/е4	е3/е3	е3/е4
Мужчины здоровые (n = 44)	0,11	0,76	0,13	0,07	0,07	0,02	0,61	0,23
Мужчины больные (n = 35)	0,16	0,63	0,21	0,06	0,11	0,09	0,40	0,34
Женщины здоровые (n = 87)	0,08	0,78	0,14	0,02	0,08	0,03	0,62	0,24
Женщины больные (n = 57)	0,09	0,71	0,20	0,04	0,07	0,04	0,49	0,37

Среди женщин, в генотипе которых отсутствовал аллель е4, количество больных было достоверно меньше (табл. 5). Эти данные, на наш взгляд, могут свидетельствовать о возможной протективной роли аллелей е2, е3. Следовательно, можно говорить о влиянии различных генотипов и аллелей гена *apoE* на развитие ССЗ у женщин. Этот вывод может быть косвенно подтвержден данными литературы о существенном влиянии аллелей гена *apoE* на уровень липопротеинов высокой плотности и триглицеридов у женщин, но не у мужчин [13]. Наличие в генотипе аллеля е4 может способствовать развитию гиперлиппротеинемии и атеросклероза, причем в большей степени у женщин, чем у мужчин [7].

Таблица 5

Соотношение здоровых и больных ССЗ женщин в зависимости от наличия аллеля е4 гена *apoE*

Женщины	Отсутствие аллеля е4	Наличие аллеля е4
Здоровые	0,65 (n = 63)	0,49 (n = 24)
Больные ССЗ	0,35 (n = 34)	0,51 (n = 23)
Критерий χ^2		3,4 ($p > 0,05$)
Критерий Фишера (F)	8,2 ($p < 0,05$)	0

Таким образом, результаты исследования показали, что у жителей Карелии, в генотипе которых имеется аллель е4, повышен риск развития кардиоваскулярных расстройств. Влияние этого аллеля на развитие ССЗ особенно выражено у женщин.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и Гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РАН» НШ-3731.2010.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боринская С. А., Кальина Н. Р., Санина Е. Д. и др. Полиморфизм гена аполипопротеина Е ApoE в популяциях России и сопредельных стран // Генетика. 2007. Т. 43. № 10. С. 1434–1440.
2. Ивантер Э. В., Коросов А. В. Основы биометрии: Введение в статистический анализ биологических явлений и процессов: Учеб. пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 1992. 168 с.
3. Титов В. Н. Физиологические основы транспорта в крови жирных кислот // Лаборатория. 1997. № 9.
4. Bernstein M. S., Costanza M. C., James R. W., Morris M. A., Cambien F., Raoux S., Morabia A. Physical activity may modulate effects of ApoE genotype on lipid profile // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002. Vol. 22. P. 133–140.
5. Dallongeville J., Lussier-Cacan S., Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis // J. Lipid Res. 1992. Vol. 33. P. 447–454.
6. Damaraju S., Yu Q. T., Safavi F., Marian A. J. Apolipoprotein epsilon 4 is not a genetic risk factor for coronary artery disease or restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty // Am. J. Cardiol. 1995. Vol. 75. P. 1181–1183.
7. Heng O. K., Saha N., Toy J. S. H. Lack of association of apolipoprotein E polymorphism with plasma Lp(a) levels in the Chinese // Clin. Genetics. 1995. Vol. 48. P. 113.
8. Hixson J. E., Vernier D. T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI // Journal of Lipid Research. 1990. Vol. 31. P. 545–548.
9. Jee S. H., Suh I., Kim I. S., Appel L. J. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease in men with low levels of serum cholesterol: The Korea medical insurance corporation study // JAMA. 1999. Vol. 282. № 22. P. 2149–2155.
10. Kuusisto J., Mykkanen L., Kervinen K., Kesaniemi Y. A., Laakso M. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995. Vol. 15. P. 1280–1286.
11. Mahley R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanded role in cell biology // Science. 1988. Vol. 240. P. 622–630.
12. Ruixing Y., Shangling P., Jinzhen W., Weixiong L., Dezhai Y. Apolipoprotein E gene polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Hei Yi Zhuang and Han populations // Exp. Biol. Med. 2008. Vol. 233. P. 409–418.
13. Shin M.-H., Kim H. N., Cui L.-H., Kweon S.-S., Park K.-S., Heo H., Nam H.-S., Jeong S.-K., Chung E.-K., Choi J.-S. The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults // J. Korean Med. Sci. 2005. Vol. 20. P. 361–366.
14. Song Y., Stampfer M. S., Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotype and risk for coronary heart disease // Annals of Internal Medicine. 2004. Vol. 141. № 2. P. 137–161.